Aus der IV. Medizinischen Universitätsklinik in Berlin am Städtischen
Robert Koch-Krankenhaus
(Direktor: Prof. Dr. Dennig)

Beitrag über die künstliche Beeinflussung der Blutgerinnungszeit

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades an der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Werner Heyde
aus Hamburg

Tag der Promotion: 25. November 1940

Druck: Karl und Richard Hoffmann, Charlottenburg, Schillerstr. 44

M 341

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Referent: Prof. Dr. Dennig
Korreferent: Prof. Dr. v. Bergmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung und Problemstellung.

II. Versuche über die Wirksamkeit verschiedener gerinnungshemmender Stoffe:
   1. Heparin.
   2. Germanin.
   3. Fucoidin.
   4. Algenstoff aus Delesseria sanguinea.

III. Versuche mit dem Algenstoff aus Delessaria sanguinea:
   1. Darstellung, Ausbeute.
   2. Aschengehalt.
   3. Prüfung auf Uronsäure.
   4. Hydrolyse mit Salzsäure.
   5. Acetylierung.

IV. Versuche mit technischen Fettalkoholsulfaten.
   1. Zusammensetzung und Eigenschaften der verwendeten Präparate.
   2. Gerinnungsbeschleunigung in vitro.
   3. Gerinnungsbeschleunigung in vivo.
   4. Wirkung auf das Blutbild.
   5. Toxische Wirkung.

V. Versuche mit bekannten gerinnungsbeschleunigenden Stoffen:
   1. Clauden.
   2. Manetol
   3. Sango-stop.
   4. Eisenchlorid.

VI. Zusammenfasssung der Ergebnisse.

VII. Literaturzusammenstellung.

Vorbemerkung.

Die Untersuchungen wurden ausgeführt in der Zeit vom Mai 1937 bis Mai 1938 im Laboratorium der IV. Medizinischen Universitätsklinik am städtischen Robert Koch-Krankenhaus, Berlin.

Die Arbeit von Heinz-Joachim Ext: Förderung der Blutgerinnung durch cetylschwefelsaures Natrium (Dissert. Berlin 1939) bildet eine Fortsetzung dieser Untersuchungen.

I. Einleitung und Problemstellung.

Der Vorgang der Blutgerinnung ist trotz vieler Theorien[14]) bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Weiteres experimentelles Tatsachenmaterial zu diesem Problem ist deshalb erwünscht. Ebenso wie in der Fermentforschung darf man einige Aufschlüsse aus einer Untersuchung erhoffen, die feststellt, welche Stoffe die Blutgerinnung hemmen und welche Stoffe den Ablauf der Blutgerinnung beschleunigen.

Die vorliegenden Untersuchungen über die künstliche Beeinflussung der Blutgerinnungszeit sollen einen kleinen Beitrag zu den aufgezeigten Problemen darstellen.

Darüber hinaus sind Mittel, mit deren Hilfe man die Blutgerinnungszeit nach Belieben verkürzen oder verlängern kann, auch von praktischer Bedeutung. Gerinnungshemmende Stoffe können das sehr teure Heparin — vor allem bei Bluttransfusionen — ersetzen. Gerinnungsbeschleunigende Stoffe haben in der Heilkunde viele Anwendungsmöglichkeiten.

Billige und hochwirksame gerinnungshemmende Präparate können ferner sogar wirtschaftliche Bedeutung erlangen, zum Beispiel zur Gewinnung von für die Ernährung wertvollem Plasma aus Schlachttierblut[17]).

II. Versuche über die Wirksamkeit verschiedener gerinnungshemmender Stoffe.

H. Elsner und W. Broser[6]), [2]) haben für den Vergleich der Wirksamkeit gerinnungshemmender Präparate den Begriff der Grenzwirksamkeit eingeführt. Sie verstehen darunter diejenige Verdünnung, bei der die Gerinnung von menschlichem Gesamtblut gerade noch deutlich meßbar (10—15 Sekunden, bei 40°) verzögert wird. Die Grenzwirksamkeit stellt für jedes Präparat eine Meßzahl dar, mit deren Hilfe die gerinnungshemmende Wirkung verschiedener Stoffe verglichen werden kann. H. Elsner, W. Broser und E. Bürgel[6]), [2]), [4]) haben bereits für eine Reihe von gerinnungshemmend wirkenden Stoffen die Grenzwirksamkeiten bestimmt (vergleiche Tabelle 2). In Fortführung dieser Versuche habe ich mit der von den genannten Autoren angegebenen Methode die Grenzwirksamkeit von zwei weiteren hemmend auf die Blutgerinnung wirkenden Stoffen festgelegt. Außer dem als Vergleichssubstanz benutzten Heparin B (Heparin-Kahlbaum)*) untersuchte ich Germanin (Bayer 205 : Carbamid der m-Aminobenzoyl-m-amino-p-methylbenzoyl-l-naphthylamin-4.6.8-trisulfosäure), auf dessen gerinnungshemmende Wirkung S. Bryuchonenko und O. Steppuhn[3]) bereits hingewiesen haben, und Fucoidin. Fucoidin wurde von G. Lunde, E. Heen und E. Oey[13]) aus der Braunalge Laminaria digitata erhalten und mir bereitwilligst überlassen. Für diesen Algenstoff habe ich erstmalig eine starke gerinnungshemmende Wirkung festgestellt. Die Meßergebnisse werden in der Tabelle 1 wiedergegeben. Für Heparin B wurde in Bestätigung der früheren Versuche[6]), [2]) die Grenzwirksamkeit 1 : 800 000 gefunden, Fucoidin hat nach meinen Versuchen die gleiche Grenzwirksamkeit, während Germanin sehr viel weniger wirksam ist (Grenzwirksamkeit 1 : 100 000).

---

*) Heparin ist nach Untersuchungen von E. Jorpes[11]) ein Mucoitin-polyschwefelsäureester.

Tabelle 1.

Substanz	Gerinnungszeit in Sekunden bei Verdünnung								
	Gerinnungszeit im Leerversuch	$1:16\cdot10^5$	$1:8\cdot10^5$	$1:4\cdot10^5$	$1:2\cdot10^5$	$1:10^5$	1 : 50000	1 : 25000	1 : 12500
Heparin B	125		132	140	150	180	205		
Germanin	185		185	185	185	195	215		
	160				160	170	190	210	240
Fucoidin	170	170	183	230	282	305			
	185	185	190	250	310	415			

Die von mir neu bestimmten Grenzwirksamkeiten habe ich noch einmal mit den früher gefundenen zusammengestellt (Tabelle 2). Für die wichtigsten gerinnungshemmend wirkenden Stoffe wird damit ein zahlenmäßiger Vergleich ihrer Wirksamkeit ermöglicht. Da die Hemmungskurven (Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Konzentration des Hemmungsstoffes) nicht für alle Stoffe einen gleichen Verlauf nehmen, kann sich die Rangordnung der in Tabelle 2 genannten Stoffe etwas verschieben, wenn man nicht die größtmöglichste sondern geringere Verdünnungen benützt (T. Astrup)[1]. Mit anderen Worten, wende ich die verschiedenen Präparate in einer zehnmal höheren Konzentration an, als zur Erreichung der Grenzwirksamkeit notwendig ist, so haben Heparin B und Fucoidin bzw. Heparin C und Germanin nicht mehr dieselbe hemmende Wirkung.

Tabelle 2.

Gerinnungshemmende Stoffe.

Präparat	Grenzwirksamkeit
Kupfersulfat + aqua	1 : 12 000
Algenstoff aus Agar Agar	1 : 30 000
Neodymacetat Praseodymacetat Guanosin	1 : 50 000
Handels-Heparin C Germanin	1 : 100 000
Liquoid Roche Algenstoff aus Carrageen	1 : 400 000
Handels-Heparin B Algenstoff aus Irideae laminarioides (Hassid) Fucoidin	1 : 800 000
Handels-Heparin A Algenstoff aus Delesseria Sanguinea	1 : 3000 000

III. Versuche mit dem Algenstoff aus Delesseria sanguinea.

Interessant wäre es nun, etwas über die Konstitution des Wirkstoffes aus der Alge Delesseria sanguinea („Blutalge") zu erfahren*). Vielleicht könnte man dann durch geringe chemische Veränderungen zu noch wirksameren Substanzen kommen.

1. Darstellung, Ausbeute.

Das Rohprodukt aus Delesseria sanguinea stellte ich auf folgende Weise dar: 50 g Blutalge blieben mit 2000 ccm Wasser und 10 ccm Toluol (als Konservierungsmittel) unter täglich viermaligem Umschütteln $3^1/_2$ Tage bei Zimmer-

*) Der von W. Hassid[10]) gefundene Stoff aus den Rotalgen Irideae laminarioides (siehe Tabelle 2) erwies sich als das Natriumsalz eines Galaktanschwefelsäureesters.

temperatur stehen. Dann wurde durch Zentrifugieren und Absaugen die etwas viscose Lösung von den ungelösten Rückständen getrennt. Anschließend wurde das Filtrat im Vacuum unterhalb 43° eingedampft und 24 Stunden im Vacuum über Calciumchlorid getrocknet. Die Ausbeute an Substanz betrug 18,8 g, d. h. 38 %. Zwecks weiterer Reinigung wurde die Substanz in destilliertem Wasser gelöst und dann mit der anderthalbfachen Menge 96 %igen Alkohols ausgefällt. Dabei blieben Salze und Verunreinigungen in Lösung. Die alkoholische Fällung wurde abfiltriert und einen Tag im Vacuum getrocknet. Die Ausbeute betrug jetzt 6,6 g = 13,3 % der Ausgangsmenge.

2. Aschengehalt.

Um zunächst einigen Anhalt über die Zusammensetzung des Algenstoffes zu gewinnen, wurde der Aschengehalt bestimmt:

	I	II	III
Einwaage:	0,2779 g	0,2236 g	0,1686 g
Glührückstand:	0,0908 g	0,0725 g	0,0528 g
% Asche:	32,7	32,4	31,3

Die Asche besteht aus Alkali- und Erdalkalisulfaten. Zum Vergleich sei noch der Aschengehalt vom Fucoidin = 26,2 bis 29,9 %[13]) und vom Heparin = 25 bis 33 %[5]) angeführt.

3. Prüfung auf Uronsäure.

Der Algenstoff gibt eine negative Naphtoresorcin-Probe[16]) auf Uronsäuren; die Ausschüttelung wurde mit Benzol vorgenommen und blieb farblos.

4. Hydrolyse mit Salzsäure.

Fehlingsche Lösung wird vom Algenstoff erst nach vorhergehendem Erhitzen mit 3- oder 5 %ig. Salzsäure reduziert. Ich bestimmte die Abhängigkeit des Reduktionsvermögens von der Kochdauer mit 3- und 5-%ig. Salzsäure nach der Methode von Hagedorn-Jensen:

Spaltung mit 3-%iger Salzsäure:

Kochdauer:	20	40	60	90	120	180 Minuten
Red.-Vermögen: (d-Glucose = 100)	15	24	29	33	35	37 Prozent

Spaltung mit 5-%iger Salzsäure:

Kochdauer:	20	40	60	90	120	180 Minuten
Red.-Vermögen: (d-Glucose = 100)	18	28	33	34	36	40 Prozent

Bei Berücksichtigung der Fehlergrenze für die Methode von Hagedorn-Jensen[9]) stimmen beide Versuchsreihen befriedigend überein. Bei Fucoidin beträgt der Zuckeranteil 33,5 bis 37,2 %[13]). Die vorstehenden Befunde stehen in gutem Einklang mit der Annahme, daß der gerinnungshemmende Algenstoff aus Delesseria sanguinea ebenfalls ein Polysaccharid-schwefelsäureester ist.

5. Acetylierung.

Weitere Versuche sollten ergeben, ob der von mir dargestellte Algenstoff als eine einheitliche Substanz zu betrachten ist.

4 g Algenstoff wurden zwecks Acetylierung mit 35 ccm Essigsäureanhydrid + 2 ccm konz. Schwefelsäure angesetzt. Nach 2 Tagen hat sich ein Teil der Substanz gelöst; beim Erwärmen in einem Wasserbad auf 40°—45° löst sich auch der Rest. Der Niederschlag wird in heißem Alkohol aufgenommen, beim Eindunsten im Exikkator hinterbleibt eine gelbbraune Masse, die sich beim Zerreiben als kristallin erweist.

Diese Substanz diente zur Schmelzpunktbestimmung:

	I. Schmelzpunktröhrchen	II. Schmelzpunktröhrchen
Sintern	132°	128°
Schmelzen	150°	150°
Vollst. geschmolzen	155°	155°

Die Schmelzpunktbestimmung des Acetats spricht dafür, daß es sich noch nicht um eine einheitliche Verbindung handelt.

Eine zweite Schmelzpunktbestimmung mit dem noch weiter gereinigtem Präparat gibt einen Schmelzpunkt bei 145° und einen zweiten Schmelzpunkt bei 160°.

Eine weitere chemische Untersuchung des Algenstoffes aus Delesseria sanguinea verspricht erst dann Erfolg, wenn es gelingt, das Rohprodukt in einheitliche Komponenten aufzuteilen.

IV. Versuche mit technischen Fettalkoholsulfaten

1. Zusammensetzung und Eigenschaft der verwendeten Präparate.

In dem Bestreben, bei weiteren hochmolekularen Schwefelsäureestern die Wirkung auf die Blutgerinnung zu untersuchen, prüfte ich auch das Präparat „Fewa", das als Waschmittel von der Böhme Fettchemie G.m.b.H. in den Handel gebracht wird. Es handelt sich dabei um ein Gemisch, das vornehmlich (zu etwa 60 %) aus Alkalisalzen der Schwefelsäureester höher molekularer aliphatischer Alkohole besteht.

Hauptbestantteile sind: laurylschwefelsaures Natrium $C_{12}H_{25}SO_4Na$, cetylschwefelsaures Natrium $C_{16}H_{33}SO_4Na$ und stearylschwefelsaures Natrium $C_{18}H_{37}SO_4Na$. Dazu kommen etwa 38 % Natriumsulfat Na_2SO_4.*).

Der Wassergehalt des Präparates Fewa beträgt 2,25 %, der im Vacuum über konz. Schwefelsäure abgegeben wird.

Die Löslichkeitsbestimmung ergab Werte von: 0,8413 g in 10 ccm Wasser bei 10°, 0,9883 g in 10 ccm Wasser bei $18^1/_2{}^0$ und 1,1087 g in physiologischer Kochsalzlösung bei $18^1/_2{}^0$. Die hergestellten gesättigten Lösungen waren klar; beim Aufbewahren über 4—6 Wochen kam es zu einer geringen Ausfällung.

Die Substanz reagiert neutral.

2. Gerinnungsbeschleunigung in vitro.

Es besteht eine deutliche Gerinnungsförderung, die sich bei allen Versuchstemperaturen zeigt. In den Ver-

*) Erst zum Schluß der Untersuchungen konnte ich, durch die freundliche Ueberlassung reiner Substanzen von der Böhme-Fettchemie, Versuche mit reinem laurylschwefelsaurem Natrium machen.

Blutgerinnungszeit in Minuten (1 ccm Lösung + 3 ccm Blut)

Versuch Nr.		mg Fewa in 1 ccm physiol. Kochsalzlösg.: 4	2	1	1/2	0	Temp. °C	Bemerkungen
1[c]	K. G.			13		22	20	
	V. G.	6	12	17		18		
2[a]	K. G.	19	22	23		43	8–10	
	V. G.	21	24	26		49		
3[a]	K. G.				10		20	
	V. G.	5	5	5	13	16		
4[c]	K. G.	5	9				19	
	V. G.	6	10			18		
5[d]		6	8	10	12	17	18 1/2	
6[c]		3 1/2	2 1/4	3 1/2		5 1/4	31	
7[c]		3	2	3	4	7	(3) 37	
8[c]		5	4	4	6	7	(3) 30	
9[b]		7	6 3/4			17 1/2	21	
10[e]		11	10	19	12	15	(3) 20	
11[f]		8	7	9	10	15	(3) 20	
12[c]		10	9	10	12	16	(3) 20	Fewa + physiol. NaCl-Lösung 30 Min. auf 100 Grad erhitzt
13[c]		15	14	15	15	17	20	2 Std. auf 100 Grad erhitzt

Zeichenerklärung:

K. G. = Kuppengerinnung
V. G. = Vollgerinnung
a = normales Blut
b = Lungenbluter
c = Hypertonie
d = Hysterie
e = Nichtblutendes Ulcus
f = Abgeklungene Angina.

suchen bei Zimmertemperatur ergeben sich Abkürzungen der Gerinnungszeit bis auf ein Drittel gegenüber dem Kontrollversuch nur mit physiologischer Kochsalzlösung. Bei niederen Temperaturen und bei höheren Temperaturen wird die Gerinnungszeit bis zur Hälfte herabgesetzt. Bei den Versuchen mit höheren Konzentrationen (mehr als 6 mg Fewa in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 3 ccm Blut) trat eine starke Hämolyse auf, die eine Gerinnung verhinderte.

Die maximale Gerinnungsbeschleunigung besteht bei einer Konzentration von 4 mg und 2 mg auf 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 3 ccm Blut.

Versuche mit Wattetupfen, die 4 Wochen vorher mit einer Fewalösung getränkt wurden, zeigen ebenfalls eine Beschleunigung der Gerinnung.

Die imprägnierte Watte behält, im Gegensatz zu Eisenchloridwatte, auch bei Luftzutritt, monatelang ihr unverändertes Aussehen.

Die Bestimmung der Grenzwirksamkeit nach H. Elsner, W. Broser und E. Bürgel[6]) ergab eine eben noch deutlich meßbare Förderung der Gerinnung bei einer Verdünnung von 1 : 200 000. Auch diese Versuche zeigen eine deutliche Zunahme der Gerinnungsförderung im Bereich der optimalen Konzentrationen.

Gerinnungszeit in Sekunden.

Vers. Nr.	Physiol. NaCl-Lösung	Fewa-Konzentrationen: $16 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	1 : 50000	1 : 2500
1	170				165	125	100	95
2	175		175	170	170	135	110	
3	165		165	165	160	110	105	

Grenzwirksamkeit 1 : 200 000

3. Gerinnungsbeschleunigung in vivo.

Nachdem eine deutliche gerinnungsfördernde Wirkung des Präparates Fewa in vitro nachgewiesen war, wurden Versuche in vivo durchgeführt.

Hierbei wurden verschiedene Mengen des Präparates Fewa sowie reines laurylschwefelsaures Natrium i. v. und i. m. bei Kaninchen gespritzt. Die intravenöse Injektion erfolgte in die Ohrvenen des Injektionsohres, desgleichen die Entnahme vor der Injektion. Die Entnahmen nach der Injektion wurden aus dem anderen Ohr gemacht, um eine deutliche Wirkung auf das Gesamtblut nachzuweisen und eine lokale Wirkung auszuschalten. Das entnommene Blut wurde dann in ähnlicher Weise, wie bei der Elsner-Broserschen Kapillarmethode untersucht:

In die mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung verschlossenen und in einem Wasserbad von 20° befindlichen Kapillaren werden 3 Tropfen Blut gegeben und vorsichtig einmal umgerührt. Durch Lösen des Verschlusses gelangt das Blut gleichmäßig in den im Wasserbad befindlichen Teil der Kapillaren. Durch leichtes Neigen der Apparatur wird der Eintritt der Gerinnung festgestellt und die Zeit mit der Stoppuhr gemessen.

Die abweichenden Doppelwerte müssen durch den zeitlichen Unterschied in der Beschickung der Kapillaren mit Blut erklärt werden. Fehlerquellen, durch Verunreinigung der Kapillaren oder durch Gewebspartikelchen in dem zu untersuchenden Blut wurden sorgfältig vermieden.

Die Versuchstiere wurden alle unter denselben Raum- und Ernährungsbedingungen gehalten. Durch Blutbilder, auf die später noch eingegangen wird, wurde außerdem der Gesundheitszustand der Versuchstiere kontrolliert. Zu den Versuchen wurden nur Tiere benutzt, die annähernd der von mir gefundenen Norm des Kaninchenblutbildes entsprachen (siehe Seite 16).

Während der Versuche und anschließend wurde das Verhalten der Versuchstiere beobachtet.

Um sicher zu stellen, daß die Gerinnungsförderung durch die Schwefelsäureester bedingt war, wurden Versuche mit physiologischer Kochsalzlösung i. v. und Natriumsulfat, das ja ein Bestandteil von Fewa ist, gemacht. In der Tabelle sind die zusammengehörenden Versuche nebeneinander aufgeführt.

Gerinnungszeit in Minuten.

Versuche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tiergewicht:	3120 g	2950 g	3350 g	2700 g	3100 g	3150 g	2750 g	2700 g	2450 g	2250 g	2300 g
Injektion:	6 ccm phys. NaCl	40 mg Na_2SO_4	50 mg Fewa	60 mg Fewa	100 mg Fewa	250 mg Fewa	250 mg Fewa	250 mg Fewa	60 mg lauryl schw. Na	60 mg lauryl schw. Na	100 mg lauryl schw. Na
g Tiergewicht	i. v.	i. v.	i. v.	i. v.	i. v.	i. v.	i. m.	i. m.	i. v.	i. v.	i. v.
pro mg inj. Substanz:			67 g : 1 mg	45 g : 1 mg	31 g : 1 mg	12,6 g : 1 mg	11 g : 1 mg	10,8 g : 1 mg	40,8 g : 1 mg	37,5 g : 1 mg	23 g : 1 mg
vor der Injektion	7,6 7,9	6,3 6,1	5,7 5,6	9,8 —	6,3 6,7	9,7 10,2	5,3 5,5	6,9	6,2 6,0	5,7 5,7	9,3 —
Nach 10 Min.					6,3 6,5						
„ 15 „		8,0 8,7		6,8 Luftbl.					6,1 5,8	5,2 5,2	7,3 —
„ 20 „			4,3 4,1		2,5 2,6						
„ 30 „							3,8 3,6		4,6 4,3	4,2 4,2	6,2 6,4
„ 35 „				1,0 1,0							
„ 40 „					1,8 2,0	2,2 3,2					
„ 45 „	7,8 7,7	7,0						5,2 5,6	3,6 3,8	3,3 3,3	3,7 3,7
„ 55 „			— 3,4		1,3 1,4						
„ 60 „							2,4 2,5		3,0 2,9	5,6 —	4,1 4,0
„ 70 „					1,1 1,1	1,2 1,5					
„ 75 „		6,5 7,1		3,3 4,0							
„ 90 „					— 3,6				4,2 4,3	3,9 3,8	(3,3) Luftbl.
„ 95 „			4,8 5,1	3,0 3,3							
„ 100 „	8,1 8,0					ca. 1,0	3,0 2,9	4,7 4,8			
„ 115 „			3,2								
„ 120 „		7,3							4,0 3,8	3,6 3,8	4,7 4,5
„ 135 „	6,8 7,0										

Versuch Nr. 1 ist der schon oben erwähnte Kontrollversuch mit physiologischer Kochsalzlösung i. v. Es zeigt sich keine Beeinflussung der Blutgerinnungszeit. Die Schwankungen von ca. 0,5 Min. um den Normalwert sind physiologisch oder durch die Methode bedingt. Bei dem Tier handelte es sich um ein Kaninchenalbino, das bei der Injektion sehr empfindlich war und Schmerzlaute ausstieß. Schädigungen traten aber während des Versuches nicht auf.

Versuch Nr. 2, ebenfalls ein Kontrollversuch, zeigt, daß Natriumsulfat in der Menge, in der es in 100 mg Fewa enthalten ist, sicher keine Wirkung auf die Blutgerinnung ausübt.

In den Versuchen 3—6 wurde Fewa in steigenden Mengen i. v. gegeben. Es zeigt sich eine deutliche gerinnungsfördernde Wirkung, welche, fast unabhängig von der Konzentration, ziemlich konstant ist. Die Wirkungsbreite ist jedoch um so größer, je stärker die Konzentration gewählt ist. Langsam, den Konzentrationen entsprechend, kehren die Gerinnungszeiten zur Norm zurück.

Die Versuche Nr. 7 und 8, in denen Fewa i. m. gespritzt wurde, zeigen ebenfalls eine deutliche gerinnungsfördernde Wirkung. Entsprechend der Diffusion des Stoffes aus den Geweben ins Blut kommt es zu einer Verzögerung der Wirkung. Die erzielten Werte sind jedoch denen der Versuche Nr. 3—6 praktisch gleichzusetzen.

Tierschädigungen traten, abgesehen von einer 5 Minuten dauernden Drucklähmung des rechten Hinterlaufes eines der Versuchstiere, nicht auf.

Die Versuche mit reinem laurylschwefelsaurem Natrium ergaben eine gerinnungsfördernde Wirkung, die jedoch die des Präparates Fewa nicht erreichte.*). (Versuch 9—11).

Bei dem Versuch Nr. 10 waren nach 6 Stunden die Venen durch die häufigen Entnahmen kollabiert, sodaß die Gerinnungszeiten nicht ermittelt werden konnten.

---

*) H.-J. Ext[8]) hat nach mir gezeigt, daß die gerinnungsfördernde Wirkung des Präparates Fewa hauptsächlich auf dem Gehalt an cetylschwefelsaurem Natrium beruht.

Tierschädigungen traten hier während des Versuches ebenfalls nicht auf.

Allgemein zeigten die Tiere außer bei dem Versuch Nr. 1, bei der Injektion keine Schmerzempfindung. Nach der Injektion von Fewa war das entnommene Blut dunkler und dickflüssiger.

Einem Kaninchen wurden 1000 mg per os gegeben, um die Verträglichkeit, sowie die Resorption der Substanz durch den Verdauungstraktus nachzuweisen. Dabei wurden verstärkte Ausscheidung von SO_4-Ionen im Urin mittels Bariumchlorid nach 24 Stunden nachgewiesen. Die Urinfarbe war gelb-braun, das Sediment o. B. Das Tier zeigte keine Veränderungen, auch keine Diarrhoen.

4. Wirkung auf das Blutbild.

Bei den Versuchen 1, 3, 5, 7 und 8 wurde die Reaktion des Blutbildes nach i. v. Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, Natriumsulfat und Fewa beobachtet, desgl. bei intramuskulärer und per oraler Applikation von Fewa.

Für das Normalblutbild von Kaninchen wurden folgende Durchschnittswerte von mir ermittelt:

Hb:	72 %
Erythrocyten:	6,10 Mill. (geringe Polychromasie)
Leukocyten:	8000
Differentialblutbild:	
Basophile:	—
Eosinophile:	3
Myelocyten:	—
Jugendliche:	—
Stabkernige:	4
Segmentkernige:	19
Lymphocyten:	69
Monocyten:	5

Hb.: %	Erythrocyten in Millionen	Bemerkungen	Leukozytenzahl	Basophile	Eosinophile	Myelocyten	Jugendliche	Stabkernige	Segmentkern.	Lymphocyten	Monocyten	Zeit
70	6.40	geringe Polychromasie	3600	—	2	—	—	1	21	69	7	vor Injekt. von 6 ccm phys. NaCl i. v.
72	6.80	„	5900	—	—	—	—	5	17	76	2	3 Std. nach Inj. von 6 ccm NaCl i. v.
75	5.60	geringe Polychrom. Anisocytose	4600	—	5	—	—	—	26	65	3	vor Injektion von 50 mg Fewa i. v.
75	4.70	deutliche Polychromasie	1800	—	—	—	—	—	3	94	3	10 Min. nach Injektion
75	5.45	„	3500	—	5	—	—	15	26	52	2	2 Std. „ „
59	5.39	geringe Poikilocytose	7900	—	6	—	—	2	22	65	5	vor Injektion von 100 mg Fewa i. v.
67	—	—	—	—	6	—	—	—	8	84	2	5 Min. nach Injektion
—	5.18	ger. Poikilocyt. Anisocytose Polychromasie	8500	—	5	—	—	8	30	48	9	24 Std. „ „
58	4.40	deutliche Anisocytose + Polychromasie	8500	—	1	—	—	2	18	70	9	48 „ „ „
56	4.81	geringe Polychromasie	6800	—	—	—	—	4	6	76	14	4 Tage „ „
—	5.20	29 % Reticulocyten	7300	—	—	—	—	2	27	68	3	7 „ „ „
65	4.86	ger. Anisocyt. + Polychrom.	6100	—	3	—	—	2	17	75	3	11 „ „ „
65	5.86	geringe Anisocytose	7700	—	2	—	—	8	29	58	3	15 „ „ „
84	6.54	—	7900	—	1	—	—	—	17	79	3	vor Injektion von 250 mg Fewa i. m.
84	6.38	—	7100	—	2	—	1	12	41	32	2	2 Std, nach Injektion
71	5.48	—	5000	—	—	—	—	6	11	78	5	24 „ „ „
74	5.98	Anisocytose, ger. Polychrom.	6700	1	2	—	—	7	16	65	8	48 „ „ „
67	5.67	Polychromasie	9800	—	—	—	—	1	5	91	3	72 „ „ „
67	6,10	geringe Anisocytose	8900	—	1	—	—	9	28	57	5	vor Injektion von 250 mg Fewa i. m.
75	6.35	„	6200	—	1	—	—	21	47	29	2	4 Std. nach Injektion
75	6.06	—	10500	—	—	—	—	2	17	81	—	20 Std. nach 1000 mg Fewa per os
71	6.10	—	9550	—	4	—	—	8	36	51	1	48 Std. nach Injektion von 250 mg Fewa i. v.
85	6.94	—	8200	1	1	—	—	12	21	64	1	28 Tage nach Injektion von 260 mg Fewa i. v.
72	5.98	gering Polychromasie	8400	—	1	—	—	2	23	70	4	vor Injektion von 200 mg Na_2SO_4 i. v.
72	5.75	„	6900	—	1	—	—	12	35	52	—	30 Min, nach Injektion

In der Tabelle sind die Versuche entsprechend der vorherigen Tabelle geordnet.

In den ersten Minuten nach der Injektion von Fewa kommt es zu einer starken Ausschwemmung von Lymphocyten (Versuch Nr. 3 und 5), nach 2 Stunden aber schon zu einer Verminderung der Lymphocyten und Vermehrung der Granulocyten (Versuch Nr. 3, 5, 7 und 8), die 24 -36 Stunden anhält. Gleichzeitig kommt es zu einem Absinken der Monocyten in den ersten Stunden und anschließendem Anstieg über die Norm in den folgenden 2—3 Tagen (Versuch Nr. 5 und 7). Die Zahl der Leukocyten zeigt kein einheitliches Bild. Jedoch kommt es entweder bald (Versuch Nr. 3 und 8), oder später (Versuch Nr. 5 und 7) zu einem Absinken der Leukocytenzahl. Die Anzahl der Erythrocyten sinkt im Verlauf von Minuten (Versuch Nr. 3) oder in 24—48 Stunden um ca. 1 Million. Im Verlauf von 3—4 Tagen kehrt sie zur Norm zurück. Es treten dabei deutliche Zeichen der Veränderung, wie Anisocytose, Poikilocytose und verstärkte Polychromasie auf. Im dicken Tropfen finden sich während der Restaurationsphase reichlich Retikulocyten (Versuch Nr. 5). Das Verhalten des Hämoglobins entspricht angedeutet dem Verhalten der Erythrocyten.

Die gleichen Veränderungen zeigten sich bei dem Tier, welches 1000 mg Fewa per os bekommen hatte, sowie bei einem Tier, welches 260 mg Fewa i. v. bekommen hatte. Von einem Tier, welchem 260 mg Fewa i. v. injiziert worden waren, wurde nach 28 Tagen ein Blutbild gemacht, welches sich als normal erwies.

Es kommt also zu einer vorübergehenden Schädigung des Blutbildes.

5. Toxische Wirkungen.

Zur Feststellung von toxischen Wirkungen wurden Kaninchen im Verlauf von mehreren Wochen große Dosen von Fewa i. v. injiziert und das Verhalten der Tiere während und nach der Injektion beobachtet.

Während der Injektion erweitern sich die Injektionsvene und benachbarte Venen maximal und färben sich wenig später dunkelblau. Nach der Injektion lassen die Tiere das Injektionsohr hängen und zeigen dort eine starke Schmerzempfindlichkeit.

Nach 3—4 Tagen treten an den Injektionsstellen Zeichen von akuter Entzündung auf, es kommt zu einer serösen, eitrigen Sekretion aus der Einstichstelle. Die Ohren sind heiß, stark durchblutet und äußerst schmerzempfindlich. Im Verlauf von mehreren Wochen bildet sich dieser Zustand zurück und nach 4—6 Wochen kommt es zu einer deutlicher Demarkationszone, später zu lokalen Nekrosen, die nach weiteren 1—2 Wochen abgestoßen werden.

Die Ohren sind dann wieder normal durchblutet, es besteht keine Schmerzempfindlichkeit mehr.

Zur Abstoßung von Nekrosen kam es vor allem bei Albinos, während bei anderen Tieren hauptsächlich die akute Entzündung ausgebildet war, die aber häufig keine größeren Gewebseinschmelzungen zur Folge hatte.

Die Annahme, daß derartige Nekrosen durch Parainjektionen entstünden, bestätigte sich nicht, obgleich doch die Tatsache der lokalen Begrenzung im Wesentlichen dafür sprach. Auch bei späteren abermaligen Injektionen in andere Venen des gleichen Ohres oder in das andere Ohr, bei denen bestimmt nicht para gespritzt wurde, traten dieselben Erscheinungen auf. Die Reaktionen verliefen in gleich starker Weise, eine Gewöhnung des Organismus an die Substanz besteht also nicht.

Auch die Annahme, daß die Nekrosen nur um die Einstichstelle herum (Bild 1, linkes Ohr), durch Diffusion des Stoffes in die benachbarten Gewebe, entstünde, erwies sich als falsch, da später auch Nekrosen, die dem Verlauf einer Vene entsprechen, beobachtet wurden (Bild 2).

Sicher ist, daß Albinos im allgemeinen empfindlicher gegenüber Fewa waren als andere Tiere.

Bei Versuchen mit reinem Natriumsulfat traten, auch schon bei der Dosis von 40 mg, die entzündlichen Erscheinungen früher und verstärkt auf. Die Annahme, daß die Schädigungen der Ohren auf diesem Stoff beruhten, erwies sich aber als irrig, da auch mit reinem laurylschwefelsaurem Natrium behandelte Kaninchen starke Beschädigungen der Ohren aufwiesen. Jedoch traten die ersten Erscheinungen bei diesen erst recht spät auf, ca. nach 2—3 Wochen. Es wurde nun versucht, die zu injizierende Menge weniger konzentriert als bisher (50 mg pro ccm bis 20 mg

Bild 1.

Bild 2.

pro ccm) zu spritzen. Dies war jedoch nicht möglich, da die Versuchstiere bei der stark verlängerten Injektionszeit sehr unruhig wurden und die Gefahr des Paraspritzens gegeben war. Die ausprobierten Konzentrationen zeigten

aber, daß die örtliche Gewebsreaktion sicher mit der Konzentration zusammenhängt, da bei niederen Konzentrationen auch die Erscheinungen weniger stark waren.

Andere Erscheinungen, wie Kreislaufschwäche oder Veränderungen des Stoffwechsels wurden nicht beobachtet.

Einem Tier wurden in 4 Dosen 750 mg Fewa innerhalb 4 Wochen i. v. injiziert. Nach einiger Zeit wurde das Tier getötet und von Leber und Nieren Präparate angefertigt.

Die makroskopische Untersuchung zeigte keine wahrnehmbaren Veränderungen. Die mikroskopische Untersuchung ergab:

Keine Nekrosen oder hämorrhagische Diathesen.

Leber: Ungleichmäßige, klein- bis mitteltropfige Verfettung der äußeren Leberläppchenhälften, kleintropfige der inneren. Glykogenarmut.

Niere: Ungleichmäßige, klein- bis mitteltropfige Verfettung der geraden Hauptstücke.

V. Versuche mit bekannten gerinnungsbeschleunigenden Stoffen.

Nachdem ich festgestellt hatte, daß die Natriumsalze von höhermolekularen Fettalkoholschwefelsäureestern die Blutgerinnung in vivo und in vitro beschleunigen, erschien es mir wünschenswert noch einige pharmazeutisch verwendete Stoffe mit gerinnungsbeschleunigender Wirkung zum Vergleich heranzuziehen.

Eine sichere gerinnungsfördernde Wirkung in deutlichem Ausmaß zeigen Speichel (vgl. z. B. Takashima[15]), und einige Schlangengifte (vgl. z. B. Klobusitzky[12]); beide Stoffe werden m. W. in der Klinik jedoch nicht angewandt.

Die im Handel befindlichen Hämostatica „Clauden", „Manetol" und „Sango-Stop" haben nach verschiedenen Literaturangaben in vitro keine Wirkung. Meine Versuche mit diesen Substanzen bestätigen diese Angaben; ja, es stellte sich heraus, daß diese in größeren Konzentrationen sogar eine geringe hemmende Wirkung auf die Blutgerinnung zeigen. Die Versuche wurden nach der eingangs beschriebenen Röhrchenmethode ausgeführt.

Blutgerinnunszeit in Minuten (1 ccm Lsg. + 3 ccm Blut)

	physiol. NaCl-Lsg.	Amp.-Inh. unverd.	1 : 2 verd.	1 : 4 verd.	1 : 8 verd.	Blut	Temp. °C
Clauden Amp. Nr. 53670	16	22	22	20	19	Hyperton.	(3) 20
Clauden Amp. Nr. 53670	14	26	25	19	17	nichtblut. Ulcus	(3) 20
Manetol Packg. Nr. DF 43—4	14	12	12	12	12	?	18½
Manetol 849986	18	14	(22)	15	16	Pyelitis	(3) 20
Manetol 849986	18	16	(29)	24	28	?	(3) 20
Sango-Stop Packg. Nr. 37803	19	40	40	22	18	Rheuma	18½

Manetol wurde in der vorgeschriebenen Weise zur Lösung gebracht und diese als unverdünntes Ausgangsmaterial benutzt.

Die Versuche zeigen im wesentlichen, daß bei höheren Konzentrationen eine gerinnungshemmende Wirkung bis zu 21 Minuten, jedoch in keinem Fall eine Gerinnungsbeschleunigung von mehr als 4 Minuten (auf 18 Minuten) eintrat.

Eine besondere Stellung nimmt das von mir außerdem untersuchte, in blutstillender Watte Verwendung findende Eisenchlorid ein. Zu den Versuchen wurde eine Solutio ferri sesquichlorati (1 ccm = 0,01 g Fe) benutzt.

Blutgerinnungszeit in Minuten (1 ccm Lösung + 3 ccm Blut)

Versuch		Lösungen von ccm Solutio ferri sesquichlorati in 1 ccm phys. NaCl							
		½ : 1	1 : 1	2 : 1	4 : 1	8 : 1	phys. NaCl	Blut	Temp.
1	K. G.	29	37	6	2		9	Hypertonie	18½ °
	V. G.	53	112	8	3		13		
2	K. G.	33	39	—	—	—	—	?	20 °
	V. G.	357	432	1	1	1	14		
3	K. G.			2	—	—	—	Hypertonie	19 °
	V. G.			4	2		18		

K. G. = Kuppengerinnung V. G. = Vollgerinnung.

Hierbei färbte sich das Blut sofort dunkelrot bis schwarz, es wurde sirupartig und zeigte teilweise, klumpenartige, unregelmäßige Gerinnung. Die fördernde Wirkung und die starke Veränderung des Blutes wird wahrscheinlich auf dem Gehalt an freier Salzsäure, sowie auf einer eiweißfällenden Wirkung der Eisenionen beruhen. Bei geringen Konzentrationen trat eine starke gerinnungshemmende Wirkung, bis zu 7 Stunden, ein.

Mit ihrer in vitro und in vivo gleichmäßig auftretenden gerinnungsfördernden Wirkung nehmen also die Natriumsalze der Fettalkoholschwefelsäureester eine besondere Stellung ein.

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die gerinnugshemmende Wirkung der Präparate Heparin und Germanin, sowie die des Algenstoffes aus Delesseria sanguinea wurde durch Bestimmung der Grenzwirksamkeit zahlenmäßig festgelegt. Fucoidin zeigt eine gleich starke gerinnungshemmende Wirkung wie das Heparin.
2. Es wurden Versuche unternommen, um die chemische Natur des wirksamen Stoffes aus Delesseria sanguinea aufzuklären.
3. Fettalkoholsulfate zeigen in vitro und in vivo eine deutliche Gerinnungsförderung. Bei dem Handelspräparat „Fewa" ist diese ausgesprochener als bei reinem laurylschwefelsaurem Natrium. In vitro kommt es, außer bei sehr hohen Konzentrationen, zu keiner Veränderung des Blutes.
4. „Fewa" bewirkt eine Schädigung des Kaninchenblutbildes.
5. Intravenöse Injektionen von „Fewa" erzeugen an Kaninchenohren akute Entzündungen und in einigen Fällen Nekrosen. Große Dosen von „Fewa" i. v. führen bei Kaninchen zu einer fettigen Degeneration von Leber und Nieren.
6. Untersuchungen mit bekannten gerinnungsfördernden Substanzen („Clauden", „Manetol", „Sango-Stop") ergeben in vitro keine Wirkung. Bei höheren Konzentrationen wurde sogar eine geringe Gerinnungshemmung beobachtet.
   Eisenchlorid zeigt eine gute fördernde Wirkung, die aber mit einer starken Veränderung des Blutes einhergeht.

Herrn Dr. H. Elsner danke ich herzlich für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen und die liebenswürdige Unterstützung bei ihrer Durchführung.

Herrn Privatdozenten Dr. Laas vom Pathologischen Institut der Hamburger Universität danke ich für die Untersuchung der pathologischen Präparate.

Literatur-Verzeichnis.

1. Astrup, T.: Enzymologia *5*, 12, 119 (1938).
2. Broser, W.: Ueber das Vorkommen gerinnungshemmender Stoffe in Rotalgen, Dissert. (Berlin 1939).
3. Bryuchonenko, S. u. O. Steppuhn: Münch. med. Wschr. *74*, 1316 (1927).
4. Bürgel, E.: Untersuchungen über die Blutgerinnung, Messung der Aktivität gerinnungshemmender Stoffe durch Bestimmung der Grenzwirksamkeit, Dissert. (Berlin 1937).
5. Charles, A. F., D. A. Scott: J. biol. chem. *102*, 425, 437 (1933).
6. Elsner, H., W. Broser, E. Bürgel: Ztschr. f. physiol. Chemie *246*, 244 (1937).
7. Elsner, H.: Ztschr. f. physiol. Chemie *252*, 196 (1938).
8. Ext, H.-J.: Förderung der Blutgerinnung durch cetylschwefelsaures Natrium, Dissert. (Berlin 1939).
9. Frostad, S.: Chem. Ztrbl. *1940*, I, 767.
10. Hassid, W. Z.: Journal of the American Chemical Society *55*, 4163 (1933).
    — Journal of the American Chemical Society *57*, 2046 (1935).
11. Jorpes, E.: Naturwissenschaften *23*, 196 (1935).
    — Biochemical Journal *29*, 1817 (1935).
    — Ztschr. f. physiol. Chemie *244*, 253 (1936).
12. Klobusitzky, D. v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. *179*, 204 (1935)
13. Lunde, G., E. Heen u. E. Oey: Ztschr. f. physiol. Chemie 247, 189 (1937).
14. Schwantke, J.: Angew. Chemie *51*, 626 (1938).
15. Takashima, M.: Ber. Physiol. *76*, 100 (1933).
16. Tollens-Elsner: Kurzes Handbuch der Kohlehydrate, 4. Aufl. (Leipzig 1935), S. 88.
17. Ziegelmayer, W.: Rohstoff-Fragen der deutschen Volksernährung, 3. Aufl. (Dresden-Leipzig 1939) S. 138 ff.

Lebenslauf.

Am 21. I. 1915 wurde ich, Werner Gerhard Heyde in Hamburg als Sohn des Oberzollinspektors Karl Heyde geboren. Nach dem Besuche einer Vorschule in Hamburg und 10-jährigem Besuch der Bismarck-Oberrealschule verließ ich diese Anstalt im Januar 1935 nach bestandener Reifeprüfung.

Am 1. IV. 1935 trat ich in die Wehrmacht ein und begann im Herbst 1935 mein Medizinisches Studium an der Universität Berlin. Im Februar 1937 bestand ich das Vorphysikum und im März 1938 das Physekum. Nach einem 2-semestrigen Studium an der Universität Hamburg, belegte ich das 3. klinische Semester wieder an der Universität Berlin. Das 4. und 5. klinische Semester studierte ich an der Universität Wien und machte dort in der Zeit von Dezember 1939 bis März 1940 das medizinische Staatsexamen.